

⑯ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A) 平3-133378

⑬ Int. Cl. 5

C 12 N 9/96
// A 61 K 39/395
G 01 N 33/531

識別記号

M 7823-4B
B 8829-4C
B 7906-2G

⑭ 公開 平成3年(1991)6月6日

審査請求 未請求 請求項の数 24 (全6頁)

⑮ 発明の名称 被験体を安定化させて液体中でのその生物学的活性を保存する方法

⑯ 特 願 平2-150093

⑰ 出 願 平2(1990)6月11日

優先権主張

⑮ 1989年7月19日 ⑯ 米国(US)⑰ 382425

⑰ 発 明 者 シン・ファイ・クワン 米国カリフォルニア州ベントウーラ、パンティング・アベニュー2422

⑰ 発 明 者 レベツカ・ジョレン・ハント 米国カリフォルニア州カルビンテリーア、ジェイ・ストリート1509

⑰ 発 明 者 アイバン・エンドレ・モドロビツチ 米国カリフォルニア州カマリロ、フリン・ロード542

⑰ 出 願 人 アイバン・イー・モドロビツチ 米国93010カリフォルニア州カマリロ、フリン・ロード542

⑰ 代 理 人 弁理士 倉内 基弘 外1名

明 細 説

安定化させる方法。

1. 発明の名称

被験体を安定化させて液体中でのその生物学的活性を保存する方法

(3) 抗体が、被験体に対する哺乳類およびその他による抗原応答によって產生される請求項

(1)記載の被験体を安定化させる方法。

2. 特許請求の範囲

(1) 被験体を液体に溶解させて溶液を形成する段階と、

活性剤、阻害剤、基質、およびその類似物を添加する段階と、

抗体、抗体フラグメント、およびそれらの混合物からなる一群から選択される安定化物質を温度に対して安定な被験体・抗体複合体を形成するのに充分な時間だけ被験体溶液に添加する段階と

からなることを特徴とする被験体を安定化させて液体中のその生物学的活性を保存する方法。

(2) 抗体が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、およびそれらの混合物からなる一群から選択される請求項(1)記載の被験体を

(4) 抗体フラグメントが、Fabフラグメント、Fcフラグメント、およびそれらの混合物からなる一群から選択される請求項(1)記載の被験体を安定化させる方法。

(5) 抗体フラグメントが、酵素による抗体の加水分解によって得られる請求項(4)記載の被験体を安定化させる方法。

(6) 酵素がババインである請求項(5)記載の被験体を安定化させる方法。

(7) 被験体が、ペプチド、蛋白質、糖蛋白質、リボ蛋白質、酵素、ハブテン、炭水化物、核酸、およびそれらの混合物からなる一群から選択される請求項(1)記載の被験体を安定化させる方法。

(8) 被験体が、前立腺酸性ホスファターゼ、アスパラギン酸アミノ基転移酵素、アラニンア

⑫公開特許公報(A) 平3-133378

⑬Int. Cl. 5
 C 12 N 9/96
 // A 61 K 39/395
 G 01 N 33/531

識別記号 M B

庁内整理番号 7823-4B
 8829-4C
 7906-2G

⑭公開 平成3年(1991)6月6日
 審査請求 未請求 請求項の数 24 (全6頁)

⑮発明の名称 被験体を安定化させて液体中でのその生物学的活性を保存する方法

⑯特 願 平2-150093

⑰出 願 平2(1990)6月11日

優先権主張 ⑲1989年7月19日 ⑳米国(US)⑳382425

㉑発 明 者 シン・ファイ・クワン 米国カリフォルニア州ベントウーラ、バンティング・アベニュー2422

㉒発 明 者 レベツカ・ジョレン・ハント 米国カリフォルニア州カルビンテリー、ジェイ・ストリート1509

㉓発 明 者 アイバン・エンドレ・モドロビツチ 米国カリフォルニア州カマリロ、フリン・ロード542

㉔出 願 人 アイバン・イー・モドロビツチ 米国93010カリフォルニア州カマリロ、フリン・ロード542

㉕代 理 人 弁理士 倉内 基弘 外1名

明 細 説

安定化させる方法。

1. 発明の名称

被験体を安定化させて液体中でのその生物学的活性を保存する方法

(3) 抗体が、被験体に対する哺乳類およびその他による抗原応答によって產生される請求項(1)記載の被験体を安定化させる方法。

2. 特許請求の範囲

(1) 被験体を液体に溶解させて溶液を形成する段階と、

(4) 抗体フラグメントが、Fabフラグメント、Fcフラグメント、およびそれらの混合物からなる一群から選択される請求項(1)記載の被験体を安定化させる方法。

活性剤、阻害剤、基質、およびその類似物を添加する段階と、

(5) 抗体フラグメントが、酵素による抗体の加水分解によって得られる請求項(4)記載の被験体を安定化させる方法。

抗体、抗体フラグメント、およびそれらの混合物からなる一群から選択される安定化物質を温度に対して安定な被験体・抗体複合体を形成するのに充分な時間だけ被験体溶液に添加する段階と

(6) 酵素がババインである請求項(5)記載の被験体を安定化させる方法。

からなることを特徴とする被験体を安定化させて液体中のその生物学的活性を保存する方法。

(7) 被験体が、ペプチド、蛋白質、糖蛋白質、リボ蛋白質、酵素、ハブテン、炭水化物、核酸、およびそれらの混合物からなる一群から選択される請求項(1)記載の被験体を安定化させる方法。

(2) 抗体が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、およびそれらの混合物からなる一群から選択される請求項(1)記載の被験体を

(8) 被験体が、前立腺酸性ホスファターゼ、アスパラギン酸アミノ基転移酵素、アラニンア

- ミノ基転移酵素、アミラーゼ、リノ酸脱水素酵素、ウレアーゼ、ヘキソキナーゼ、グルコース-6-リノ酸脱水素酵素、ペルオキシダーゼ、クレアチニンリノ酸化酵素、グルタミン酸脱水素酵素、およびアルカリ性ホスファターゼからなる一群から選択される酵素である請求項(1)記載の被験体を安定化させる方法。
- (9) 被験体が、酸化還元酵素、転移酵素、加水分解酵素、脱離酵素、異性化酵素、および合成酵素からなる一群から選択される酵素である請求項(1)記載の被験体を安定化させる方法。
- (10) 被験体・抗体混合物を高温度に加熱して、被験体・抗体複合体の形成を促進する請求項(1)記載の被験体を安定化させる方法。
- (11) 高温度がほぼ大気温度乃至約65℃である請求項(10)記載の被験体を安定化させる方法。
- (12) 被験体・抗体複合体を形成する時間が1秒乃至数日の範囲である請求項(1)記載の被験体を安定化させる方法。
- 蛋白質、およびそれらの混合物からなる一群から選択される蛋白質の溶液である請求項(18)記載の被験体を安定化させる方法。
- (20) 基質がヒトまたは動物の血清、あるいはそれらの混合物である請求項(18)記載の被験体を安定化させる方法。
- (21) 基質が、生物体液の化学的診断に用いられる試薬である請求項(18)記載の被験体を安定化させる方法。
- (22) 被験体を前記被験体の抗体、あるいは抗体フラグメントと反応させる段階が含まれることを特徴とする被験体を熱的または化学的分解から保護する方法。
- (23) 前立腺酸性ホスファターゼ(PAP)を、PAPを用いて誘導された全ポリクローナル抗体、およびババイン消化によって形成されたそのポリクローナル抗体フラグメントと反応させる段階が含まれることを特徴とする血清中のPAPを安定化させる方法。
- (24) アルカリ性ホスファターゼ(ALP)を、ALPを(13) 安定化された複合体を、粒子径制御滤過器を用いて滤過する段階が更に含まれる請求項(1)記載の被験体を安定化させる方法。
- (14) 粒子径制御器具が、滤過器、分子ふるい、樹脂、中空纖維、および螺旋カートリッジ式排除器からなる一群から選択される請求項(13)記載の被験体を安定化させる方法。
- (15) 滤過器が無菌滤過器である請求項(14)記載の被験体を安定化させる方法。
- (16) 滤過器が約0.2μmまたはそれ以下の孔眼寸法である請求項(14)記載の被験体を安定化させる方法。
- (17) 安定化された複合体を基質中で希釈する段階が更に含まれる請求項(1)記載の被験体を安定化させる方法。
- (18) 基質が、試薬、緩衝液、塩類溶液、蛋白質溶液、および高分子溶液からなる一群から選択される請求項(17)記載の被験体を安定化させる方法。
- (19) 蛋白質溶液が、ヒトの蛋白質、ヒト以外の用いて誘導された全ポリクローナル抗体、およびババイン消化によって形成されたそのポリクローナル抗体フラグメントと反応させる段階が含まれることを特徴とする血清中のALPを安定化させる方法。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は、抗体あるいは抗体フラグメントを用いて被験体を安定化させて、液体中のその生物学的活性を保存する方法に関する。

[従来の技術]

高分子量の生体分子の生理的活性は、その一次構造はもとより、二次および三次構造に依存することが多い。纖維状、球状、その他の構造の分子が公知である。ある高分子(例えば酵素)の特徴的な立体構造の解体によって、その分子の活性は著しく減少し、破壊されることがある。分子の三次構造の変化は、熱、強い酸または塩基、およびその他の条件を用いてこれを引き起こすことができる。

臨床および研究の両方面で性能を發揮する酵素、ホルモン、およびその他の生体分子の使用は、充分に確立されている。そのような化合物は、しばしば単離が困難であり、かつその製造が高価である。これらの、およびその他の被験体をその生理的活性を破壊する変性、分解、およびその他の過程から保護することが所望される。

医療および研究業界においては、抗体と抗原との間の相互作用が30年以上も各種の検出方法に利用されている。広く慣用の手法としては、組織の染色、放射線免疫検定法、酵素免疫検定法、蛍光免疫検定法、および免疫電気泳動がある。それぞれの場合に、抗体が特定の抗原と特異的に結合するという独特の能力が利用されている。

抗体は、体内への抗原の導入に応じて形成されるある種の球状蛋白質として一般的に定義づけることができる。抗体は分子量が約160,000であって、モノクローナルおよびポリクローナ

の会合が可能である。不变部領域の分子的構造の差異が免疫グロブリンの分類群およびその下位群を特定する。群は主として5種類存在し、当業界ではそれぞれ、IgG、IgA、IgM、IgD、およびIgEと称されるが、IgGが最も一般的である。

ある与えられた抗体は、その対応抗原、またはそれと類似の分子構造の抗原とのみ反応する。対照的に、ある与えられた抗原は、1種類以上の形態の抗体と反応することができる。この相互作用を説明するのに「鍵と錠前」の類比がしばしば用いられる。すなわち、抗原は、ある抗体の対応する構造的形状、すなわち「錠前」に正確に嵌合する「鍵」のようなものである。非共有結合によって、この複合体は安定化され、相互に固定される。

抗原と抗体の相互作用は、もっぱら3種類の力、すなわち、ファンデルワールスおよびロンドンの力(双極子同士の相互作用)、疎水性相互作用、およびイオン(クーロン力による)結合からもたらされる。

ル抗体産生の手法を用いてこれを製造することができる。

抗原は、特異的な体液性または細胞性免疫の産物と反応する物質として定義づけることができる。換言すれば、抗原とは、抗体と特異的な様式で反応する物質のことである。天然および合成抗原としては、蛋白質、炭水化物、核酸、脂質など、多種類の形態が公知である。抗体自身も抗原として作用することができる。ハブテンは、特定の抗体と反応することができる小型の分子であるが、複合形態で注射されない限り特異的な抗体産生を誘発することができない。換言すれば、ハブテンは、高分子の担体、例えばウシ血清アルブミンと複合されなければならない。

抗体には、それぞれ「可変」領域および「不变部」領域と称される、機能的に明確に区別される2カ所の領域がある。可変領域は、化学的な共有結合を形成することなく抗原と結合することができる。不变部領域は、細胞の受容体と

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、抗体に固有の特性を利用して、液体の媒体中での抗原(この場合の「被験体」)の安定化を図る方法を提供することにある。したがって、本発明は、処理上望ましい特性(例えば無菌的な濾過の可能性)を有する安定化された被験体標本の提供を目的とする。このような方法には、抗体、あるいは抗体フラグメントを蛋白質、酵素、およびその他の被験体と結合させて、例えば被験体分子内のペプチド鎖などの自発的なたたみ込み、あるいはたたみ込みの解体を防ぐ段階が含まれる。更に、結合する抗体または抗体フラグメントは、蛋白質分解性の酵素、および各種の酸化性化合物から被験体(酵素も含む)を遮蔽する。抗体を用いて安定化された被験体は、その生物活性を保持している。

本発明の好適実施例においては、塩類溶液に被験体を加え、次いで、この溶液に抗体、あるいは抗体フラグメントを加えることによって、

安定化された被験体を調製する。溶液を搅拌および加熱し、次いで、冷却および濾過するのが好ましい。次いで、濾液を希釈して、所望の濃度の規定の基質とする。安定化された複合体の調製中および調製後における溶液の、抗体を用いて安定化された被験体の活性を検定する。

[課題を解決するための手段]

本明細書中で用いられる限りにおいて、「被験体」なる用語は、抗原となり、あるいは抗原と協働することが可能な高分子を指すものとする。ペプチド、蛋白質、糖蛋白質、リボ蛋白質、酵素、炭水化物、核酸などがその例である。より特定的には、下記の酵素、すなわち、前立腺酸性ホスファターゼ、アスパラギン酸アミノ基転移酵素、アラニンアミノ基転移酵素、アミラーゼ、リンゴ酸脱水素酵素、ウレアーゼ、ヘキソキナーゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、ペルオキシダーゼ、クレアチニン酸化酵素、グルタミン酸脱水素酵素、およびアルカリ性ホスファターゼが、本発明を用いて安定化させる

体の形成に至るような抗原性の応答を誘発させることによって、ポリクローナル抗体を産生させることができる。この哺乳類より採血した後、標準的分画手法を用いて、それぞれ特定の被験体に特異的な各種の抗体を単離する。このようにして産生された抗体を被験体と結合させると、安定化された被験体・抗体複合体を形成することができる。これに用いる哺乳類としては、ラット、マウス、靈長類、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、ウシ、ウマ、およびその他がある。

被験体・抗体複合体溶液の調製後、安定化された被験体・抗体複合体の形成に充分な時間、溶液を搅拌および加熱する。反応系に応じて、平衡に達する時間は、秒単位、時間単位、あるいは日単位にわたることがある。典型的には、被験体・抗体溶液を大気温度乃至約65℃にて数分乃至数時間加熱する。温度を上昇させると、安定化された被験体・抗体複合体の形成が促進されるばかりか、溶液中の安定化を損なうような酵素の活性が低下し、あるいは完全に抑えら

ることができる被験体の若干の代表例である。以下、「抗原」とは、抗原および前記抗原の機能部分を意味するものとする。

本発明によれば、被験体の安定化は、適当な溶媒に被験体を溶解させる段階から始まる。酵素、抗体、およびその他の球状蛋白質は一般に、水、あるいは酸、塩基、または塩類の水溶液に可溶である。そうでない被験体は、水性または非水性の溶液中でこれを溶媒和化させることができる。0.5~30%塩類溶液を用いるのが好適である。

被験体溶液を調製したならば、これに所定量の抗体を加える。1種類を越える抗体を加えることができる。本発明に用いられる抗体の調製、単離、および精製は、当業界の技術の習熟者が理解する各種の方法によることができる。モノクローナル抗体、およびポリクローナル抗体を用いて安定化された被験体溶液を調製することが可能である。例えば、哺乳類を宿主として問題の被験体をこれに注射し、それによって、抗

れさえする。

安定化に充分な時間が経過した後は、被験体・抗体複合体溶液を冷却し、濾過し、次いで、被験体含量の検定を行う。平衡に達せしめた溶液を適当な粒子径制御装置、例えば、濾過器、分子ふるい、樹脂、中空纖維、および螺旋カートリッジ式排除器を通過させることによって、濾過を実施することができる。0.2μmの孔眼寸法の無菌濾過器を用いるのが好適である。所望の場合、試薬、緩衝液、塩類溶液、蛋白質溶液、高分子溶液、およびそれらの混合液として調製され得る基質を濾液に加えて、これを希釈することができる。本発明において好適とされる蛋白質の基質液は、基本的には、哺乳類の血清、例えば、ヒト、ウシ、ウマ、ブタ、またはウサギの血清および類似の成分、あるいはそれらの混合物を用いて構成される。所望の通りの蛋白質基質で希釈することによって、抗体を用いて安定化被験体の活性を調整することができる。所望に従って、蛋白質溶液を加熱し、冷却し、

更に滤過することができる。

ある種の被験体は、これを完全な抗体分子と反応させると、ほとんどの抗体の抗体結合価が一般に二価であることも手伝って、不溶性の免疫複合体を形成する傾向があることが判明している。免疫複合体は、極めて高分子量であり、不溶、かつ、無菌滤過などの処理手法に不適当であることが多い。

したがって、本発明の好適実施例においては、抗体のFabフラグメント、あるいは完全な抗体とFabフラグメントとの混合物が被験体溶液に加えられる。Fabフラグメントの抗体結合価は、一価であるから、不溶性免疫複合体の形成は回避され、安定化および滤過可能性という利点が得られる。

抗体のフラグメント化には、多数の方法を用いることができる【ディー・ダブリュー・ウェア・ターナー(D. W. Weir Turner)およびスタンワース(Stanworth)：「実験免疫学ハンドブック(Handbook of Experimental Immunology)」、

第2版(1973年)、英國オックスフォード所在、ブラックウェル・サイエンティフィック・パブリケーション社発行】(本書は参照によって本発明に組み込まれる)。好適な方法は、酵素、例えばババインを用いたババイン加水分解法である。ババイン(ババヨチンとも称される)は、実質的に熱に安定な酵素であって、蛋白質分子を「消化する」、すなわち断片化する能力がある。水性媒体中で抗体をババインで処理すると、3本の抗体フラグメント、すなわち、「Fab」なるフラグメント2本と「Fc」なるフラグメント1本とが生じる。Fcとは、抗体分子の「不变の(constant)」領域が含まれるフラグメントであることを示す。

Fabフラグメントにはそれぞれ、1カ所の抗原結合部位(「可変」領域)が存在し、完全な抗体分子と同様に抗原と結合することができる。対照的に、Fcフラグメントは、しばしば抗原結合能を欠いているが、もとの抗体の抗原性および生物学的特性の多くを保存している。

[実施例]

実施例1：安定化されたヒト前立腺酸性ホスファーゼ(ACP)の調製

安定化されたACPを下記の要領で調製する。ACPを4℃にて0.9%塩化ナトリウム10mlに加えて、濃度を877国際単位とする。この溶液にFab 6mgを加える。ここで、「Fab」は、各種ポリクローナル抗体のババイン加水分解によって生じる抗体フラグメントを意味するものとする。抗体は、哺乳類を宿主としてACPで誘発した抗原応答に対応して産生されたものである。

溶液を室温にて4時間震盪する。次いでIgG 4.8mgをこれに加える。ここで、「IgG」は、上記の要領で調製されたポリクローナル抗体の完全な分子を意味するものとする。

溶液を室温にて1晩震盪し、次いで56℃にて36分間加热する。

溶液を4℃に冷却し、孔眼寸法が0.2μmの滤過器を用いて滤過する。

慣用の手法を用いて、滤液のACPを検定する。

蛋白質の基質を加えて滤液を希釈し、57℃にて30分間加热し、次いで4℃に冷却する。

再び、滤液を0.2μmの滤過器を用いて滤過する。

上記の要領で調製した安定化ACPの酵素活性を第1表に示す。異なる温度における安定性を調べた。得られた結果は、高温における3日間の後でも酵素活性が高く保たれることを示している。対照溶液は、4℃での経過時間ゼロの時点におけるACP濃度が1.00国際単位であった。

第1表
安定化ACPの安定性の促進

摘要	溶液を表示の温度で72時間保存した後のACPの活性(国際単位)		
	4℃	41℃	47℃
安定化処理	1.23	1.32	1.00
未処理の対照	0.20	0	0

低温での長期間の安定性を調べ、結果を第2表に示す。ACP活性は、71日後でさえ保たれている。「R.T.」は室温を意味する。

第2表
安定化ALPの長期的な安定性

		表示の温度における保存期間(日)					
		6	13	27	41	56	71
安定化処理	4°C	1.69	1.79	—	1.94	—	1.88
	R.T.	1.84	1.92	1.78	2.00	1.96	1.94
未処理の対照	R.T.	0	—	—	—	—	—

実施例2：安定化されたウシ腸管アルカリ性ホスファターゼ(ALP)の調製

下記の要領で安定化ALPを調製する。

ALPを0.9%塩化ナトリウム溶液に加えて、濃度を18,500国際単位とする。

Fab120mgを上記の溶液12mlに加え、得られた溶液を室温にて2時間震盪する。Fabは、ALPで誘導したポリクローナル抗体のババイン加水分解によって調製したものである。

上記混合液にIgG25mgを加える。ここで、IgGは、哺乳類を宿主としてALPで誘発された抗原応答に応じて産生された、ポリクローナル抗体の完全な分子である。

混合液を室温にて1晩震盪する。

混合液を57°Cにて35分間加熱し、次いで、4

°Cに冷却し、孔眼寸法が0.2μmの濾過器を用いて濾過する。

ALPの検定後、濾液に蛋白質の基質を加えて所望の濃度に希釈し、57°Cにて30分間加熱し、更に4°Cに冷却する。

次いで、安定化された溶液を孔眼寸法が0.22μmの濾過器を用いて濾過する。

ALPの短期間(促進的条件)および長期間の安定性について調べた結果を、それぞれ第3表および第4表に示す。

第3表
安定化ALPの安定性の促進

溶液を表示の温度で6日間保存した後のALPの活性(国際単位)			
	4°C	41°C	47°C
安定化処理	482	461	437
未処理	450	135	68

第4表
安定化ALPの長期的な安定性

表示の温度における保存期間(日)						
	6	13	27	41	56	71
安定化処理	4°C	374	384	—	387	—
	R.T.	370	381	372	380	385
未処理	R.T.	200	100	—	—	—

上記の要領による被験体の安定化によって、変性および分解に導くような条件に耐え、かつその生物活性がかなりの期間保持される標本が形成される。

当業界の技術の習熟者には、本発明の基本的精神および対象範囲から逸脱することなく、本発明に多数の追加的変更および改良をなし得ることが理解されるものと思われる。したがって、本発明は、上記の説明に限定されるのではなく、先に記載の請求範囲にのみ限定されるものである。

代理人の氏名 倉内基弘

同 風間弘志



BK

United States Patent [19]

Kwan et al.

[11] Patent Number: 5,660,978
[45] Date of Patent: Aug. 26, 1997

[54] STABILIZATION OF ANALYTES

[75] Inventors: Shing Fai Kwan, Ventura, Calif.; Ivan E. Modrovich, 96 Natalie Way, Camarillo, Calif. 93010; Rebecca Jolene Hunt, Carpinteria, Calif.

[73] Assignee: Ivan E. Modrovich, Camarillo, Calif.

[21] Appl. No.: 483,375

[22] Filed: Jun. 7, 1995

Related U.S. Application Data

[63] Continuation of Ser. No. 956,838, Oct. 5, 1992, which is a continuation of Ser. No. 382,425, Jul. 19, 1989, abandoned.

[51] Int. Cl. 6 C12Q 1/70

[52] U.S. Cl. 435/5; 435/188; 436/8; 436/16; 436/18; 436/512; 436/176; 436/826

[58] Field of Search 435/5, 188; 436/512, 436/8, 16, 18, 176, 826

[56] References Cited

U.S. PATENT DOCUMENTS

4,157,280 6/1979 Halbert et al.
4,267,272 5/1981 Josephson.
4,652,524 3/1987 Modrovich.

OTHER PUBLICATIONS

Sternberger et al., "The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry," *J. Histochem. Cytochem.* 18: 315-333 (1970).

Sawada et al., "Human prostatic acid phosphatase (EC-3.1.3.24) Stabilization of prostatic acid phosphatase against thermal inactivation by the homologous antibody," *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 29:2935-2939 (1981), abstract only.

Cheridnickova et al., "Evidence for the stabilizing effect of antibodies on the subunit association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase," *Mol. Immunol.* 18: 1055-1064 (1981), abstract only.

Melchers et al., "Enhanced stability against heat denaturation of *E. coli* wild type and mutant β -galactosidase in the presence of specific antibodies," *Biochem. Biophys. Research Comm.* 40: 570-575 (1970).

Boyd et al., *Fundamentals of Immunology, Third Edition* (Interscience Publishers, Inc., New York) pp. 318-326 (1956).

Mason et al., "Preparation of peroxidase:Antiperoxidase (PAP) complexes for immunohistological labeling of monoclonal antibodies," *J. Histochem. Cytochem.* 30:1114-1122 (1982).

Primary Examiner—Christine M. Nucker

Assistant Examiner—Jeffrey Stucker

Attorney, Agent, or Firm—Christie, Parker & Hale, LLP

[57] ABSTRACT

A method for stabilizing analytes with antibodies and antibody fragments comprises dissolving the analyte in a liquid to form a solution, adding analyte-specific antibodies, fragments of such antibodies, or both to the solution, heating the solution, and then cooling and filtering the solution. The filtered solution may be diluted in a suitable matrix.

39 Claims, No Drawings

STABILIZATION OF ANALYTES
CROSS-REFERENCE TO RELATED
APPLICATION

This is a continuation of application Ser. No. 07/956,838, filed Oct. 5, 1992, which is a continuation of Ser. No. 07/382,425, filed Jul. 19, 1989, now abandoned.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The physiological activity of many macromolecular biomolecules depends upon their tertiary and secondary structures, as well as their primary structures. Molecules with fibrous, globular, and other structures are known. Deconvolution of conformational features of a macromolecule (e.g., an enzyme) can significantly reduce or even destroy the molecule's activity. Changes in the tertiary structure of a macromolecule can be caused by heat, strong acids or bases, and other conditions.

The use of enzymes, hormones, and other biomolecules in both clinical and research capacities is well established. Such compounds are often difficult to isolate and expensive to manufacture. It is desirable to protect these and other analytes from denaturation, degradation, and other processes that destroy physiological activity.

The medical and research communities have exploited the interaction between antibodies and antigens for a variety of detection methodologies for over 30 years. Common techniques include tissue staining, radioimmunoassaying, enzyme immunoassaying, fluorescence immunoassaying, and immunoelectrophoresis. In each case, the unique ability of an antibody to bind specifically to a particular antigen is exploited.

An antibody may be broadly defined as a globular protein formed in response to the introduction of an antigen. Antibodies have molecular weights of about 160,000, and may be produced by monoclonal and polyclonal techniques.

An antigen may be defined as a substance which reacts with the products of specific humoral or cellular immunity; in other words, antigens are substances that react in a specific manner with antibodies. Numerous types of natural and synthetic antigens are known, including proteins, carbohydrates, nucleic acids, and lipids. Antibodies themselves can act as antigens. Haptens are small molecules that can react with specific antibodies, but do not elicit specific antibody production unless injected in a conjugated form. In other words, the hapten must be conjugated to a high molecular weight carrier such as bovine serum albumin.

An antibody has two functionally distinct regions, called the "variable" region, and the "constant" region, respectively. The variable region can bind to an antigen without the formation of covalent chemical bonds. The constant region can associate with cellular receptors. Differences in the molecular make-up of the constant regions define particular classes and subclasses of immunoglobulins. There are five principal classes, denoted in the art as IgG, IgA, IgM, IgD and IgE, with IgG being the most prevalent.

A given antibody can react only with its homologous antigen, or with an antigen of similar molecular structure. In contrast, a given antigen may interact with more than one type of antibody. A "key-lock" analogy is often used to describe the interaction; the antigen resembles a key which precisely fits an antibody's corresponding structural shape, or "lock." Non-covalent binding stabilizes the complex and holds it together.

The antigen-antibody interaction is primarily a result of three forces: van der Waal's and London forces (dipole-

dipole interactions), hydrophobic interactions, and ionic (coulombic) bonding.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides a process for the stabilization of antigens ("analytes" herein) in a liquid medium, utilizing the unique properties of antibodies. The invention thus provides stabilized analyte preparations which have desirable processing characteristics (e.g., the ability to be aseptically filtered). The process comprises binding antibodies or antibody fragments to proteins, enzymes, and other analytes, to prevent the spontaneous folding or unfolding of, e.g., peptide chains within the analyte. Additionally, the bounding antibody or antibody fragment shields the analyte (including enzymes) from proteolytic enzymes and various oxidizing compounds. The antibody-stabilized analytes retain their bioactivity.

In a preferred embodiment of the invention, a stabilized analyte is prepared by adding the analyte in a saline solution, then adding antibodies or antibody fragments to the solution. The solution is preferably agitated and heated, and then cooled and filtered. The filtered solution is then diluted into a defined matrix of desirable concentration. The solution is assayed for antibody-stabilized analyte activity during and after the preparation of the stabilized complex.

DETAILED DESCRIPTION

As used herein, the term "analyte" refers to a macromolecule that can provide or coact with an antigen. Examples include peptides, proteins, glycoproteins, lipoproteins, enzymes, carbohydrates, and nucleic acids. More particularly, the following enzymes are representative of some of the analytes which may be stabilized with the present invention: prosthetic acid phosphatases, aspartate aminotransferases, alanine aminotransferases, amylases, malate dehydrogenase, ureases, hexokinases, glucose-6-phosphate dehydrogenases, peroxidases, creatine kinases, glutamate dehydrogenases, and alkaline phosphatases. Hereinafter, "antigen" shall mean antigens and the functional parts of such antigens.

In accordance with the present invention, an analyte is stabilized by first dissolving the analyte in an appropriate solvent. Enzymes, antibodies, and other globular proteins are typically soluble in water or aqueous solutions of acids, bases or salts. Other analytes may be solvated in aqueous or nonaqueous solutions. Preferably a 0.5% to 30% saline solution is used.

Once a solution of the analyte has been prepared, a predetermined amount of antibodies is added to the analyte solution. More than one type of the antibody may be added. The antibodies used in the present invention may be prepared, isolated, and purified by a variety of methods that will be understood by those skilled in the art. Stabilized analyte solutions can be prepared with monoclonal and polyclonal, antibodies. For example, polyclonal antibodies may be produced by injecting the analyte of interest into a host mammal, thereby inducing an antigenic response that results in antibody formation. After bleeding the mammal, standard fractionation procedures are used to isolate various types of antibodies, each of which is specific to the particular analyte. The antibodies so produced can be combined with the analyte to yield a stabilized analyte-antibody complex. Mammals include rats, mice, primates, goats, sheep, rabbits, cows, horses and the like.

After an analyte-antibody solution is prepared, the solution is agitated and heated for a period of time sufficient to

allow formation of a stabilized analyte-antibody complex. Depending on the system equilibrium may be reached in seconds, hours, or days. Typically the analyte-antibody solution is heated for several minutes to several hours, at temperatures of ambient to about 65° C. In addition to accelerating the formation of a stabilized analyte-antibody complex, elevated temperatures reduce or even eliminate instable enzymatic activity of the solution.

After a stabilizing amount of time has passed, the analyte-antibody solution may then be cooled, filtered, and assayed for analyte content. Filtration may be accomplished by passing the equilibrated solution through a suitable size control device, such as a filter, molecular sieves, resins, hollow fibers, and spiral cartridge exclusions. Preferably, a 0.2 micron aseptic filter is used. If desired, the filtered solution may be diluted by adding the solution to a matrix which may be a chemical reagent, a buffered solution, a salt solution, protein solution, polymer solutions and mixtures thereof. A presently preferred protein matrix solution essentially consists of a stabilized preparation of mammalian serum, such as human, bovine, equine, porcine, rabbit serum and the like components, or mixtures thereof. The antibody-stabilized analyte is used to adjust the activity by diluting into protein matrix as desired. The protein solution may be heated, cooled and filtered as desired.

It has been found that certain analytes tend to form insoluble immunocomplexes when allowed to react with whole antibody molecules, in part because of the generally divalent nature of most antibodies. Immunocomplexes have extremely high molecular weights, may be insoluble, and may be unsuited for processing techniques such as aseptic filtration.

Accordingly, in a preferred embodiment of the invention, antibody Fab fragments or mixtures of whole antibodies and Fab fragments are added to the analyte solution. Because Fab antibody fragments are monovalent, formation of insoluble immunocomplexes is avoided, and the benefits of stabilization and filterability are achieved.

The fragmentation of antibodies may be accomplished in a number of ways.¹ A preferred method is papain hydrolysis using enzymes such as papain. Papain (also called papayotin) is an enzyme with substantial thermostability. It is capable of "digesting" or fragmenting protein molecules. Treatment of an antibody with papain in an aqueous medium yields three antibody fragments: two "Fab" fragments and one "Fc" fragment. Fc denotes a fragment which includes the "constant" region of the molecule.

¹ "Handbook of Experimental Immunology," Stanworth and Turner, D. W. Weir 2nd Ed. 1973, Blackwell Scientific Publication, Oxford (incorporated herein by reference).

Each Fab fragment possesses one antigen-combining site (the "variable" region), and may combine with an antigen in a manner similar to a whole molecule antibody. In contrast, the Fc fragment often lacks antigen-binding capability, but retains many antigenic and biological properties of the parent antibody.

EXAMPLE 1

Preparation of stabilized Human Prosthetic Acid Phosphatase (ACP)

Stabilized ACP was prepared as follows:

ACP was added to 10 ml of 0.9% NaCl at 4° C. to yield an ACP concentration of 877 IU. 6 mg of Fab was added to the solution. Here, "Fab" denotes antibody fragments formed by papain hydrolysis of various polyclonal antibodies. The

antibodies were formed in response to an ACP-induced antigenic response in a host mammal.

The solution was rocked at room temperature for four hours. 4.8 mg of IgG was then added to the solution. Here, "IgG" denotes whole molecule polyclonal antibodies prepared as described above.

The solution was rocked overnight at room temperature, then heated for 36 minutes at 56° C.

The solution was cooled at 4° C., and filtered through a 0.2 micron filter.

The filter solution was assayed for ACP, using conventional techniques.

The filtered solution was diluted by adding a protein matrix, heated at 57° C. for 30 minutes, and then cooled to 4° C.

The solution was again filtered through a 0.2 micron filter.

Enzymatic activity of stabilized ACP prepared in the above manner is shown in Table 1. The stability studies were conducted at different temperatures. The results show that enzymatic activity remained high even after three days at elevated temperatures. The control solution had an ACP concentration of 1.00 IU at time 0° at 4° C.

TABLE 1

	Accelerated Stability of Stabilized ACP		
	Activity of ACP (in IU) after solutions were stored at 72 hours at temperature shown		
	4° C.	41° C.	47° C.
Pilot			
Stabilized	1.23	1.32	1.00
Control	0.20	0	0
Untreated			

The results of long-term stability studies, carried out at lower temperatures, are shown in Table 2. ACP activity remained even after 71 days. "RT" denotes room temperature.

TABLE 2

Storage time in day/	Accelerated Stability of Stabilized ACP						
	Storage Temp	6	13	27	41	56	71
Stabilized							
4° C.		1.69	1.79	NA	1.94	NA	1.88
R.T.		1.84	1.92	1.78	2.00	1.96	1.94
Untreated							
R.T.		0	NA	NA	NA	NA	NA

EXAMPLE 2

Preparation of stabilized Calf Intestine Alkaline Phosphatase (ALP)

Stabilized ALP was prepared as follows:

ALP was added to a 0.9% NaCl solution to yield an ALP concentration of 18500 IU.

120 mg of Fab was added to 12 ml of the above solution, and the resulting solution was rocked for two hours at room temperature. The Fab was prepared by papain hydrolysis of ALP-induced polyclonal antibodies.

25 mg of IgG was added to the mixture. Here, IgG denotes whole molecule polyclonal antibodies prepared in response to an ALP-induced antigenic response in a host animal.

The mixture was rocked overnight at room temperature.

The mixture was heated at 57° C. for 35 minutes, then cooled to 4° C. and filtered through a 0.2 micron filter.

After assaying for ALP, the filtered solution was diluted to a desirable concentration by adding it to a protein matrix, heated at 57° C. for 30 minutes, and cooled to 4° C.

The stabilized solution was then filtered through a 0.22 micron filter.

The results of short-term (accelerated conditions) and long-term stability studies of stabilized ALP are shown in Tables 3 and 4 respectively.

TABLE 3

<u>Accelerated Stability of Stabilized ALP</u>			
	Activity of ALP (in IU) after solutions were stored for 6 days at temperature shown		
	4° C.	41° C.	47° C.
Stabilized	482	464	437
Untreated	450	135	68

TABLE 4

Storage time in day/ Storage Temperature	<u>Long-Term Stability of Stabilized ALP</u>					
	6	13	27	41	56	71
<u>Stabilized</u>						
4° C.	374	384	NA	387	NA	387
R.T.	370	381	372	380	385	383
<u>Untreated</u>						
R.T.	200	100	NA	NA	NA	NA

Stabilization of analytes in the manner described above yields preparations which resist denaturing and degrading conditions, and which retain their bioactivity for a substantial period of time.

It will be appreciated by those skilled in the art that a number of additional modifications and improvements can be made to the invention without departing from its essential spirit and scope. Accordingly, the above disclosure does not limit the invention, which is limited only by the following claims.

What is claimed is:

1. A method for stabilizing a labile protein analyte to preserve biological activity against chemical degradation in an aqueous solvent which comprises the steps of:

- dissolving an analyte in an aqueous solvent selected from the group consisting of water, aqueous solutions of acids, aqueous solutions of bases and aqueous solutions of salts to form a protein analyte solution;
- adding to the protein analyte solution a stabilizing amount of a soluble antibody substance to the protein analyte, said antibody substance selected from the group consisting of whole polyclonal antibodies and a mixture of whole polyclonal antibodies and polyclonal antibody fragments;
- allowing stabilizing antibody substance and the protein analyte to react for a time sufficient to form a

solution of an aseptically-filterable, biologically-active, stable protein analyte-antibody complex; and

(d) aseptically filtering the biologically-active protein analyte-antibody complex, said aseptically filtered protein-antibody complex having a stability of at least 72 hours at 41° C. in an aqueous solvent for said complex.

2. A method as claimed in claim 1, wherein the solvent is a 0.5 to 30% saline solution.

3. A method as claimed in claim 1, wherein the antibodies are generated from mammalian antigenic response to the analyte.

4. A method as claimed in claim 1, in which antibody fragments are Fab fragments formed by enzymatic hydrolysis digestion of whole polyclonal antibodies.

5. A method as claimed in claim 1, wherein the analyte is selected from the group consisting of peptides, proteins, glycoproteins, lipoproteins, haptens, and mixtures thereof.

6. A method as claimed in claim 1, wherein the protein analyte is an enzyme selected from the group consisting of prosthetic acid phosphatases, aspartate aminotransferases, alanine aminotransferases, amylases, malate dehydrogenase, ureases, hexokinases, glucose-6-phosphate dehydrogenases, peroxidases, creatine kinases, glutamate dehydrogenases, and alkaline phosphatases.

7. A method is claimed in claim 1, wherein the protein analyte is an enzyme selected from the group consisting of oxidoreductases, transferases, hydrolases, lyases, isomerases, and ligases.

8. A method as claimed in claim 1, in which the mixture of protein analyte and antibody substance is heated to an elevated temperature to accelerate formation of the protein analyte antibody complex.

9. A method as claimed in claim 8, in which the elevated temperature is up to about 56° C.

10. A method as claimed in claim 1, wherein the time to form the analyte-antibody complex ranges from 1 second to several days.

11. A method as claimed in claim 1, wherein filtration is with a size control device is selected from the group consisting of filters, molecular sieves, resins, hollow fibers, and spiral cartridge exclusions.

12. A method as claimed in claim 1, wherein filtration is through a filter having a mesh size of about 0.2 micron or less.

13. A method as claimed in claim 1, further comprising the step of diluting the stabilized complex in a matrix.

14. A method as claimed in claim 13, wherein the matrix is selected from the group consisting of chemical reagents used for chemical diagnosis of biological fluids, buffered solutions, salt solutions, protein solutions, polymer solutions, human serum, and animal serum.

15. A method as claimed in claim 14, wherein the protein solution is selected from the group consisting of human proteins, non-human proteins, and mixtures thereof.

16. A method as claimed in claim 14, wherein the matrix is human or animal serum, or mixtures thereof.

17. A method for stabilizing a protein analyte against chemical degradation in an aqueous solvent to preserve biological activity of said protein analyte in a solution which comprises:

a) dissolving at least one protein analyte which is an enzyme selected from the group consisting of prosthetic acid phosphatases, aspartate aminotransferases, alanine aminotransferases, amylases, malate dehydrogenase, ureases, hexokinases, glucose-6-phosphate dehydrogenases, peroxidases, creatine kinases, glut-

- mate dehydrogenases, alkaline phosphatases in an aqueous solvent selected from the group consisting of water, aqueous solutions of acids, aqueous solutions of bases and aqueous solutions of salts to form a protein analyte solution;
- b) adding to the protein analyte solution containing the protein analyte a stabilizing amount of a soluble stabilizing antibody substance to said analyte, said antibody substance selected from the group consisting of whole polyclonal antibodies, and combinations of fragments formed by enzymatic hydrolysis of said polyclonal antibodies and said whole polyclonal antibodies;
- c) allowing the stabilizing antibody substance and the protein analyte to react for a time sufficient to form a solution of an aseptically-filterable, biologically-active, protein analyte-antibody complex; and
- d) aseptically filtering the biologically-active protein analyte-antibody complex to form a protein-antibody complex having a stability of at least 72 hours at 41 ° C. in an aqueous solution of said complex.

18. A method as claimed in claim 17, in which the enzymatic hydrolysis is performed by papain.

19. A method as claimed in claim 17, in which the analyte-antibody mixture is heated to a temperature above 40 ° C. up to about 56 ° C. to accelerate formation of the analyte-antibody complex.

20. A method as claimed in claim 17, wherein the time to form the analyte-antibody complex ranges from 1 second to several days.

21. A method as claimed in claim 17, wherein filtration occurs with a filter having a mesh size of about 0.2 micron or less.

22. A method as claimed in claim 17, further comprising the step of dilution the stabilized complex in a matrix.

23. A method as claimed in claim 22, wherein the matrix is selected from the group consisting of chemical reagents used for chemical diagnosis of biological fluids, buffered solutions, salt solutions, protein solutions, polymer solutions, human serum, and animal serum.

24. A method of stabilizing a labile protein analyte to preserve against loss of biological activity by chemical degradation in the presence of water which comprises:

- a) dissolving a protein analyte in a liquid solvent selected from the group consisting of water, aqueous solution of acids, aqueous solution of bases and aqueous solution of salts in which the protein analyte retains biological activity to form a protein analyte solution;
- b) adding to the protein analyte solution soluble Fab fragments formed by enzymatic hydrolysis of polyclonal antibodies specific for said analyte;
- c) adding soluble whole polyclonal antibodies specific for said analyte to the dissolved protein analyte solution containing the added Fab fragments, the total amount of said Fab fragments and polyclonal antibodies being added in a total amount sufficient to stabilize the protein analyte;
- d) incubating the resultant protein analyte solution containing the added Fab fragments and polyclonal antibodies for a time sufficient to form an aseptically filterable solution of a protein analyte-antibody complex formed by complexing the protein analyte with the Fab fragments and polyclonal antibodies; and
- e) aseptically filtering the incubated stable protein analyte-antibody complex to form a filtered stabilized solution, said analyte antibody complex retaining biological activity for at least 72 hours at 41 ° C. in an aqueous solution of said complex.

25. A method as claimed in claim 24, in which the enzymatic hydrolysis is performed by the papain.

26. A method as claimed in claim 25, wherein the analyte is an enzyme selected from the group consisting of prostatic acid phosphatases, aspartate aminotransferases, alanine aminotransferases, amylases, malate dehydrogenase, ureases, hexokinases, glucose-6-phosphate dehydrogenases, peroxidases, creatine kinases, glutamate dehydrogenases, and alkaline phosphatases.

27. A method as claimed in claim 24, in which the analyte-antibody mixture is heated to from about ambient temperature to about 56 ° C. during formation of the analyte-antibody complex.

28. A method as claimed in claim 24, wherein filtration occurs using a filter having a mesh size of about 0.2 micron or less.

29. A method as claimed in claim 24, further comprising the step of adding the stabilized analyte antibody complex to a matrix.

30. A method as claimed in claim 24, wherein the matrix is selected from the group consisting of chemical reagents used for chemical diagnosis of biological fluids, buffered solutions, salt solutions, protein solutions, polymer solutions, human serum, and animal serum.

31. A method of stabilizing a protein analyte in solution wherein the biological activity of the protein analyte is preserved against chemical degradation in an aqueous solvent, which comprises:

- (a) dissolving a protein analyte which is an enzyme selected from the group consisting of prostatic acid phosphatases, aspartate aminotransferases, alanine aminotransferases, amylases, malate dehydrogenase, ureases, hexokinases, glucose-6-phosphate dehydrogenases, peroxidases, creatine kinases, glutamate dehydrogenases, alkaline phosphatases in a 0.5 to 30% saline solution in which the protein analyte retains biological activity to form a protein analyte solution;
- (b) adding to protein analyte solution a first stabilizing antibody comprising soluble Fab fragments formed by enzymatic hydrolysis of polyclonal antibodies formed by a mammalian antigenic response to the analyte;
- (c) adding to the dissolved protein analyte solution containing the added first stabilizing antibody fragments a second stabilizing soluble while polyclonal antibody substance and specific to the analyte, the total amount of added Fab fragments and whole polyclonal antibodies being sufficient to stabilize the protein analyte;
- (d) incubating the resultant protein analyte solution containing the added first and second antibody stabilizing substances for a time sufficient to form an aseptically filterable solution of protein analyte-antibody complex formed by complexing the protein analyte with the first and second antibody stabilizing substances; and
- (e) aseptically filtering the incubated stable protein analyte-antibody complex to form a complex that is stable for at least 72 hours at 41 ° C. in an aqueous solution of said complex.

32. A method as claimed in claim 31, wherein the size control device is a filter having a micron mesh of about 0.2 micron or less.

33. A method as claimed in claim 31, in which the enzymatic hydrolysis is performed by the papain.

34. A method as claimed in claim 32, in which the enzymatic hydrolysis is performed by the papain.

35. A method as claimed in claim 31 in which the filtered complex is combined with a matrix is selected from the

group consisting of chemical reagents used for chemical diagnosis of biological fluids, buffered solutions, salt solutions, protein solutions, polymer solutions, human serum, and animal serum heated and refiltered.

36. A method of stabilizing human prostatic acid phosphatase in solution, wherein the biological activity of the prostatic acid phosphatase is preserved against chemical decomposition, which comprises:

- (a) dissolving prostatic acid phosphatase in a 0.5 to 30% saline solution in which the prostatic acid phosphatase retains biological activity to form a protein analyte solution;
- (b) adding to the protein analyte solution containing dissolved prostatic acid phosphatase soluble Fab antibody fragments formed by papain digestion of polyclonal antibodies derived from mammalian antigenic response to prostatic acid phosphatase;
- (c) adding to the solution, containing the prostatic acid phosphatase and added Fab antibody fragments, a soluble polyclonal antibody substance formed from mammalian antigenic response to prostatic acid phosphatase to form a resultant protein analyte solution;
- (d) incubating the resultant protein analyte solution for a time sufficient to form a solution of prostatic acid phosphatase complexed with the added polyclonal antibody and polyclonal Fab antibody fragments; and
- (e) aseptically filtering the incubated stable complex to form a complex which is stable for at least 72 hours at 41° C. in an aqueous solvent for said complex.

37. A method as claimed in claim 36 in which the filtered complex is combined with a matrix is selected from the group consisting of chemical reagents used for chemical diagnosis of biological fluids, buffered solutions, salt solutions, protein solutions, polymer solutions, human serum, and animal serum and then heated and refiltered.

38. A method of stabilizing human prostatic acid phosphatase in solution, wherein the biological activity of the prostatic acid phosphatase is preserved against chemical decomposition, which comprises:

- (a) dissolving prostatic acid phosphatase in a 0.5 to 30% saline solution in which the prostatic acid phosphatase retains biological activity;
- (b) adding to the protein analyte solution containing dissolved prostatic acid phosphatase soluble Fab antibody fragments formed by papain digestion of polyclonal antibodies derived from mammalian antigenic response to prostatic acid phosphatase;
- (c) adding to the solution containing the prostatic acid phosphatase and added Fab antibody fragments, a soluble whole polyclonal antibody substance formed from mammalian antigenic response to prostatic acid phosphatase to form a resultant protein analyte solution;
- (d) incubating the resultant protein analyte solution for a time sufficient to form a solution of prostatic acid phosphatase complexed with the added polyclonal antibody and polyclonal antibody Fab fragments; and
- (e) aseptically filtering the incubated stable complex to form a complex which is stable for at least 72 hours at 41° C. in an aqueous solvent for said complex.

39. A method as claimed in claim 38 in which the filtered complex is combined with a matrix is selected from the group consisting of chemical reagents used for chemical diagnosis of biological fluids, buffered solutions, salt solutions, protein solutions, polymer solutions, human serum, and animal serum, then heated and refiltered.

* * * * *